Erlangen 1939

Aus dem chemischen Laboratorium der Medizinischen Klinik
Erlangen (Prof. R. Greving —
ausgeführt unter dem Direktorat von Prof. L. R. Müller).

Über die Umwandlung von Carotin zu Vitamin A

in der Säugetierleber.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexanders-Universität Erlangen

vorgelegt von

Hans Graebner
aus Schliersee

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 10. 1938.

1939
Buchdruckerei Karl Döres, Erlangen, Jägerstraße 3

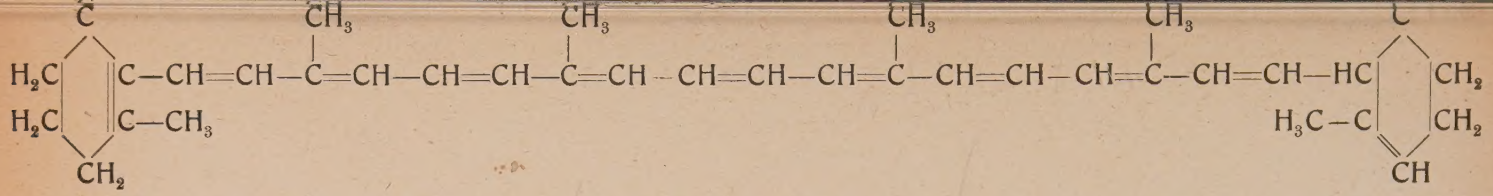
Referent: Professor Dr. L. R. Müller.

Dekan: Professor Dr. R. Greving.

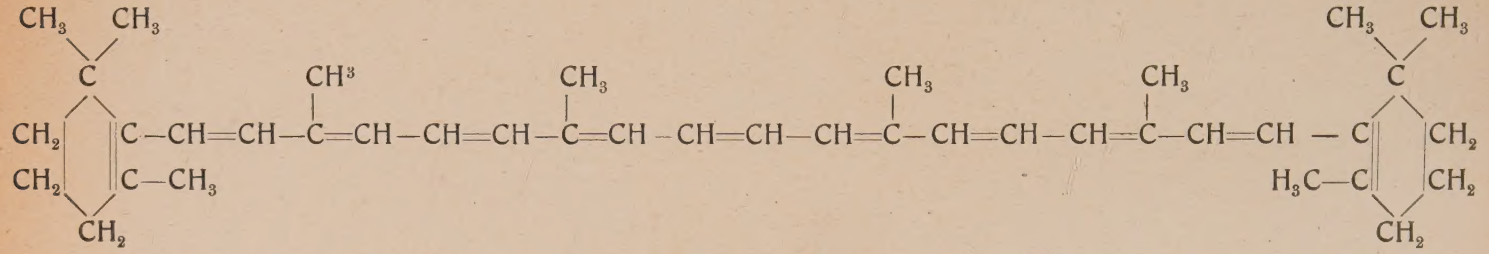
A. Allgemeiner Teil.

In der verhältnismäßig jungen Lehre von den Vitaminen ist es einer großen Anzahl von Forschern gelungen, ihre Reihe ständig zu vergrößern und ihre Chemie und ihre Zusammenhänge untereinander zu klären. Mußte doch die Erkenntnis, daß die dauernde Zufuhr dieser schon in den kleinsten Mengen wirksamen Stoffe notwendig ist, um den gesunden Organismus zu erhalten, für die praktische Medizin, besonders die ursächliche Therapie von größter Wichtigkeit und Tragweite sein.

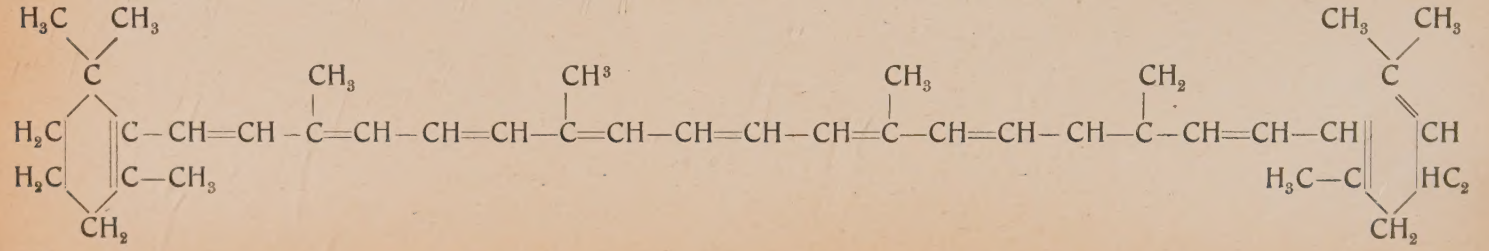
Eines der aufschlußreichsten Ergebnisse der Vitaminforschung war wohl die in den letzten Jahren gelungene Reindarstellung und die Ermittlung der Konstitution von Vitamin A, sowie die Aufdeckung der Zusammenhänge mit den Carotinoiden (H. von Euler, W. Karrer, L. Schöpp) (1). Es ist heute eine kaum umstrittene Tatsache, daß Carotin im Organismus der meisten Tiere als Provitamin A wirkt. Es können aber nur solche Carotinoide in Vitamin A umgewandelt werden, die zum mindesten in einer Hälfte ihres Moleküls den β-Jonon-Ring aufweisen (2). Der Ort, in dem diese Umwandlung im Organismus stattfindet, soll nach Th. Moore (3) die Leber sein. Sicher ist, daß Vitamin A zum größten Teil in der Leber gespeichert wird, weshalb diese von größter Bedeutung für den Vitamin-A-Stoffwechsel ist. Sehr interessant ist die gefundene Tatsache, daß reine Fleischfresser, die ihren Vitamin-A-Bedarf mit der aufgenommenen Nahrung decken, nicht imstande sind, Carotin in Vitamin A umzuwandeln, während Pflanzenfresser diese Umwandlung immer durchführen können. Chemisch erfolgt die Umwandlung dadurch, daß jeweils ein Molekül β-Carotin sich unter Wasseranlagerung in zwei Hälften spaltet.[1]) Zwei Moleküle Vitamin A entstehen nur beim β-Carotin; α und γ-Carotin, die nur einen β-Jonon-Ring enthalten, können nur je ein Molekül Vitamin A liefern.[2]) Tatsächlich erweist sich auch bei Testversuchen, daß β-Carotin doppelt so wirksam als α und γ-Carotin ist. Ueber die genauen Unterschiede in der Wirkungsgröße herrscht noch keine Uebereinstimmung der einzelnen Versuchsergebnisse.



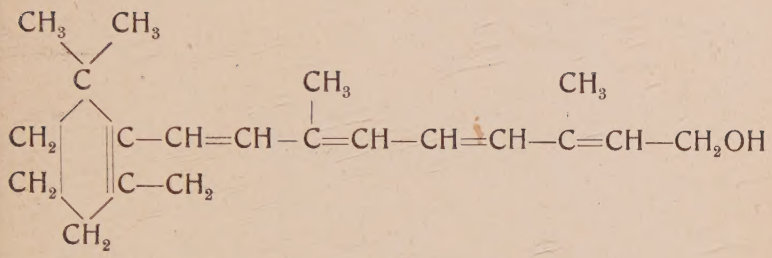
-Jonon-Ring α-Carotin ($C_{40}H_{56}$) α Jonon-Ring



β-Jonon-Ring β-Carotin β-Jonon-Ring



β-Jonon-Ring γ-Carotin γ-Jonon.



Vitamin A ($C_{20}H_{30}O$).

Um nun diese Umwandlung von Carotin in Vitamin A in ihren einzelnen Phasen erfassen zu können und womöglich den quantitativen Zusammenhang zu erkennen, versuchten C. Olcott und Mc. Cann (4) diese Umwandlung in Vitro durchzuführen und verwandten dazu einen sorgfältig mit Sand zerriebenen Leberbrei von Ratten-Lebern. Das Ergebnis ihrer Versuche war, daß Carotin in Vitamin A unter Zuhilfenahme frischen Lebergewebes oder eines wässerigen Auszuges davon übergeführt werden könne. Sie nahmen an, daß das die Umwandlung hervorrufende Agens ein Ferment, die Karotinase sei.

Diese Versuche wurden von J. Roe und Drummond (5), sowie von H. von Euler und Klussmann (6) wiederholt. Das Versuchsmaterial waren wieder fein zermahlene Lebern von Ratten. Es gelang diesen Forschern nicht, die Versuchsergebnisse von Olcott und Cann zu bestätigen, ebenso konnten sie kein Ferment, das Carotin in Vitamin A hätte umwandeln können, nachweisen.

Diese widersprechenden Versuchsergebnisse mußten naturgemäß zur Weiterbearbeitung der zweifellos festgestellten Tatsache, daß Carotin im Säugetier-Organismus in Vitamin A umgewandelt wird, Veranlassung geben.

Dr. W. Schuler hat mir die Anregung gegeben, neuerdings Versuche über die Umwandlung von Carotin in Vitamin A in der Säugetierleber anzustellen, und zwar die Durchführbarkeit dieser Umwandlung im Reagenz-Glase mit überlebenden Organschnitten zu erproben, nachdem W. Reindel u. W. Schuler im Laboratorium der medizinischen Klinik der Nachweis erbracht worden ist, daß bisher in vitro gelungene Synthesen (Harnsäure, Adrenalin) der lebenden, strukturell geschonten Gewebe bedürfen.

B. Besonderer Teil.

1. Der Nachweis von Vitamin A.

Neben den biologischen Testmethoden zur Bestimmung von Vitamin A haben eine Reihe von Autoren einige chemische Reaktionen ausgearbeitet, von denen die bekanntesten die von Fearon (7), Bessanoff (8) und Carr Price (9) sind. Die gebräuchlichste und wohl in den meisten Laboratorien angewandte Methode ist die von Carr Price. Nach ihr gibt Vitamin A mit einer gesättigten Antimontrichlorid-Lösung in gewaschenem und gut getrocknetem Chloroform eine Blaureaktion, die allmählich abklingt und schon nach wenigen Minuten gänzlich verschwunden ist. Ein weiterer Nachteil dieser Reaktion ist, daß auch das Carotin selbst wie auch die Vitamin A unwirksamen Carotinoide, wenn auch in etwas geringerem Grade, diese Blaufärbung liefern. C. Corbet, der sich näher mit der Carr Price'schen Reaktion befaßte, stellte neuerdings eine ganze Reihe von Stoffen fest, die ebenfalls eine Blaufärbung mit Antimontrichlorid liefern, oder diese stark beeinflussen. E. Rosenthal (10) veröffentlichte eine Modifikation der Carr Price'schen Reaktion, nach der die Blaufärbung durch Zugabe von Guajakol und nach Erwärmen in eine rotviolette beständige Farbe übergeht. Carotin gibt diese Reaktion nicht. Auf diese Veröffentlichung brachte M. von Eekelen (11) eine Erwiderung, nach der diese Reaktion

1. weit weniger empfindlich ist als die ursprünglich von Carr Price angegebene,
2. nicht für Vitamin spezifisch ist und auch von Cholesterin gegeben wird,
3. bei dem, dem Vitamin A verwandten in der Literatur als „572 Chromogen" bekannten Stoff eine rote Farbe gibt, die die Vitamin-A-Bestimmung stören kann.

Ch. Bomskov in seinem Buch „Methodik der Vitaminforschung" gibt eine Behauptung von R. Pummerer und Rebmann [1]) wieder,

1) Eine Anfrage bei den genannten Autoren ergab, daß diesen hierüber nichts bekannt ist.

nach der angeblich auch zerstörtes Vitamin A unwirksames Carotin, die Blaureaktion mit $SbCl'_3$ geben soll. Hierüber wurden folgende Versuche angestellt:

I. 20 ccm einer 5 mg %igen Carotinlösung in Phosphatpufferlösung von ph. 7,4 wurden

a) sofort nach Herstellung,

b) nach zweistündigem Schütteln im Thermostaten

auf ihren Gehalt an Carotin untersucht. Genaue Beschreibung des Versuchsganges wird im Versuchsteil gegeben.

	Konzentr. von Carotin	Gelbwert und errechnete mg %	Blauwert und errechnete mg %	zu findende Menge in mg % n. Aufnahme in 10 ccm Chloroform
Versuch I				
sof. Unters.	20 ccm einer 5 mg% Lsg. i. Puff.	21=9 mg%	16=9,5 mg%	10 mg %
n. 2 Std.	do.	45=3,6 mg%	29=6 mg%	do.
Versuch II				
sof. Unters.	50 ccm einer 1 mg% Lsg. i. dest. Wasser	37=4,75 mg%	40=4,5 mg%	5 mg %
n. 2 Std. Steh. a. Lft.	do.	90=0,5 mg%	40=4,5 mg%	do.
Versuch III				
sof. Unters.	50 ccm einer 1 mg% Lsg. i. Puff.	53=3 mg%	42=4 mg%	5 mg %
n. 4 Std. unt. Stickstoff	do.	61=2 mg%	42=4 mg%	do.
Versuch IV				
sof. Unters.	25 ccm einer 4 mg% Lsg. in Wasser	24=8 mg%	16,5=9,25 mg%	10 mg %
n. 5 Std. unt. Kohlens.	do.	48=3,3 mg%	16=9 mg%	do.

Diese Versuche, die abwechslungsweise mit Pufferlösung von ph. 7,4 und Wasser gemacht wurden, lassen erkennen, daß oxydiertes Carotin imstande ist, die Antimontrichlorid-Reaktion zu liefern. Bei den vorgenannten Versuchen wurde die Aufarbeitung des Materials im Kohlensäure- bzw. im Stickstoffstrome vorgenommen. Daß Carotin nur unter Kohlensäure oder Stickstoff unverändert bleibt, war für den weiteren Gang der Arbeit von größter Wichtigkeit, da mit lebenden Organzellen gearbeitet wird. Es war

daher von vorneherein anzunehmen, daß oxydiertes Carotin bei den Hauptversuchen entstehen wird, das nicht mehr durch die gelbe Farbe als Carotin nachgewiesen werden kann, während es eine positive Blaureaktion liefert und so von dem eigentlichen Endwert vom Vitamin A in Abzug gebracht werden muß. Um die genauen Abzugswerte zu erhalten, wurde in jedem Versuch eine Carotinlösung von gleicher Konzentration wie im Vollversuch im Thermostaten mitgeschüttelt und denselben Versuchsbedingungen unterworfen.

Die große Empfindlichkeit der Blaureaktion gegenüber Wasser machte ein sehr sorgfältiges Arbeiten zur Bedingung. Schon die geringsten Spuren von Wasser genügen, um eine Trübung der Blaureaktion hervorzurufen, die die Versuchsergebnisse weitgehendst stört und unbrauchbar macht. War in seltenen Fällen bei der Bestimmung eine Trübung entstanden, so konnte man sie folgendermaßen zum Verschwinden bringen:

Konzentrierte Salzsäure bringt die durch Wasser entstandene Trübung, sowie die Blaureaktion auf Vitamin A und Carotin zum Verschwinden, ohne dabei diese beiden Stoffe zu verändern. Der technische Teil dieser Enttrübung ist relativ einfach durchzuführen, da Chloroform, das ja allgemein als Lösungsmittel für Vitamin A und Carotin verwendet wird, sich mit Salzsäure nicht mischt und im Scheidetrichter wieder leicht abgeschieden werden kann.

	Abgem. Menge Vit. A bezw. Carotin	Vor Trübung mit $SbCl_3$ versetzt abgel. Wert.	Nach Trübung mit HCl ausgew. und wieder bestimmt.
Versuch I	30 Einh. V. A. in 1 ccm Chlorof.	18,5 = 90 Einh. in 3 ccm	18 = 92 Einh. in 3 ccm = 30,0 i. 1 ccm
Versuch II	$2\,^1/_3$ mg% Carot. in Chloroform	Gelb 55=$2\,^1/_3$ Blau 63=$2\,^1/_3$	Gelb 57=$2\,^1/_3$ mg% Gelb 57=$2\,^1/_3$ mg% Blau 63=$2\,^1/_3$ mg%
Versuch III	40 Einh. i. 1 ccm Chlorof. (Vit. A)	14=117 Einh. in 3 ccm	13=122 Einh. in 3 ccm = 40 i. 1 ccm
Versuch IV	4 mg% Carot. in Chloroform	Gelb 41,5=4 Blau 47=3,75	Gelb 39=4,3 mg% Blau 42=4,25 mg%

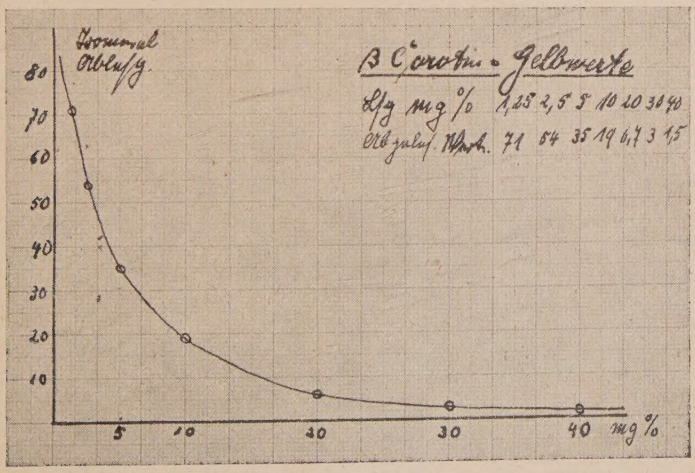
Wichtig ist, daß man die aus dem Scheidetrichter wieder erhaltene Lösung vor der neuen Bestimmung mit wasserfreiem Natriumsulfat gut trocknet.

Bei der Wahl einer Methode zur quantitativen Bestimmung von Vitamin A neben Carotin kommen nur zwei Wege in Betracht.

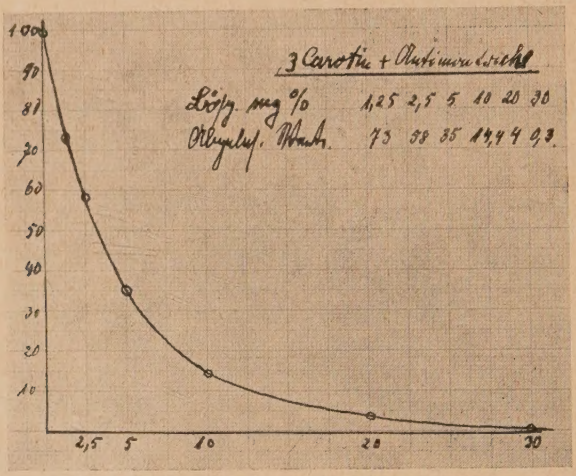
Die Untersuchungen können auf colorimetrische und spektroskopische Weise durchgeführt werden. Letztere war wegen des Fehlens der technischen Hilfsmittel bei uns nicht durchführbar. Für die colorimetrische Methode wurde von anderen Forschern vor allem das Lovibond - Tintometer, sowie ein Mikro - Hellige - Colorimeter und Authenrieth - Colorimeter verwandt. Neuerdings wurde auch das Zeiß'sche Stufenphotometer dazu benützt und soll ausgezeichnete Ergebnisse geliefert haben (12). Auch unsere Versuche wurden mit dem Stufenphotometer durchgeführt und es sollen nähere Einzelheiten hierüber im Versuchsteil beschrieben werden.

2. Aufstellung der Meßkurven und Beschreibung der Vorversuche.

Wie bereits erwähnt, wurde zur mengenmäßigen Bestimmung das Stufenphotometer von Zeiß verwendet. Zunächst mußten Meßkurven angefertigt werden. Zu diesem Zwecke wurden genau abgewogene Mengen von ß-Carotin in getrocknetem Chloroform gelöst und diese Lösungen bekannter Konzentration im Stufenphotometer mit Filter „S 54" und Chloroform als Vergleichslösung auf Farbgleichheit eingestellt. Zur Bestimmung wurde die 10 mm Küvette verwendet mit einem Inhalt von 3 ccm. Die gefundenen Werte, bei der die Lösungskonzentration als Abszisse und die Trommelablesung als Ordinate aufgetragen wurde, lieferte bei oftmaligen Kontrollversuchen immer zuverlässige Werte.



Um für die spätere Umrechnung bei der durch Carotin und Antimontrichlorid hervorgerufenen Blaufärbung gegenüber der von Vitamin A gegebenen ein Maßsystem zu haben, wurden nun β-Carotin-Lösungen bekannter Konzentration mit Antimontrichlorid-Lösung versetzt. 3 ccm der Carotin-Lösung wurden im Reagenzglase mit 1 ccm $SbCl_3$ versetzt und jeweils mittels Stoppuhr genau nach 25 Sekunden abgelesen.

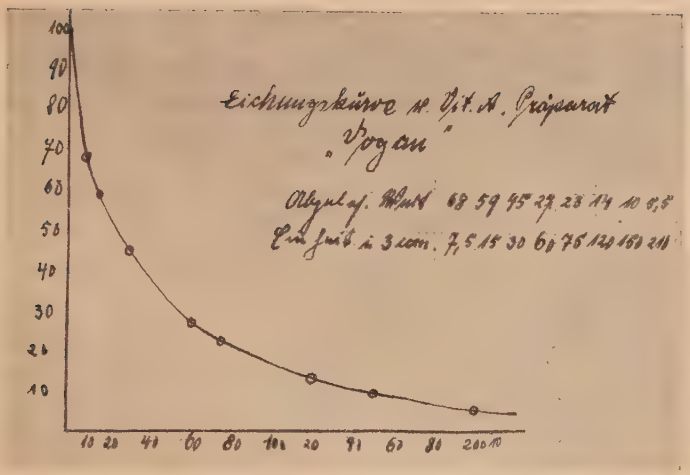


Ebenso wurde auch die Meßkurve für Vitamin A aufgestellt. Es wurden immer genaue Mengen des auf internationale Einheiten standarisiertem Vitamin A Präparates „Vogan" abpipettiert und mittels Chloroform auf bestimmte Konzentrationen verdünnt. Bei Ausführung der Carr Price'schen Reaktion wurde genau so verfahren wie im vorhergehenden Falle.

Bei beiden Kurven wurden ebenfalls zahlreiche Kontrollversuche vorgenommen, die die Richtigkeit des Kurvenverlaufes sicherstellten. Die Blaureaktion der Kurve, Carotin + Antimontrichlorid, sowie Vitamin A + Antimontrichlorid, wurde mittels Filter „S 57" abgelesen.

Um nun ein genaues Ergebnis darüber zu erhalten, ob man mittels dieser 3 Kurven unter Umrechnung

1. der Carotingelbwerte in Carotinblauwerte und
2. diese Carotinblauwerte wieder in abzuziehende Vitamin-A-Einheiten,



die abgewogenen Mengen Carotin und Vitamin A nach Mischung nebeneinander wiederfindet, wurden nachstehende Versuche angestellt.

Abgewogene Mengen Carotin und Vitamin A wurden in der gleichen Menge Chloroform gelöst und in der angegebenen Weise untersucht. Dabei wurden folgende Werte gefunden:

	Zug. Menge Car. i. mg %	Gelbw. Mischg. Best.	Nach Kurve gef. Carotin	Blauw. a/ Car. Bl. Kur. Best.	Ber. a/ Bl. Einh. d. Vit. A Kurve	Zugeg. Menge Vit. A.	Tr. Abl. u. Bl. B. d. Mschg.	Vit. A i. 3 ccm. gefund.
1.	4,00mg%	42	4,00mg%	44	30 Einh.	20 E.	32= 50	20 E.
2.	5,00mg%	36	5,00mg%	35	44 „	50 „	13=122	78 „
3.	2,5 mg%	54	2,5 mg%	61	12 „	50 „	17,5= 96	84 „
4.	5,00mg%	36	5,00mg%	35	44 „	50 „	13=122	78 „
5.	5,00mg%	36	5,00mg%	35	44 „	25 „	19,5= 86	42 „
6.	2,5 mg%	54	2,5 mg%	61	12 „	25 „	29= 56	44 „
7.	1,66mg%	65	1,66mg%	69	6 „	100 „	11=138	132 „

Die Bestimmung der gesuchten Menge Vitamin A und β-Carotin geschah auf folgende Weise: Da Vitamin A farblos ist, konnte zunächst der Carotin-Gehalt durch die Gelbfärbung der Lösung bestimmt werden. Dann wurde zu dem auf der Trommel abgelesenen Wert der zugehörige β-Carotin-Wert auf der Gelbkurve aufgesucht. Es wurden in jedem Falle die zugegebenen Mengen Carotin gefunden. Nach dieser gefundenen Menge Carotin wurde

nun auf der Carotinblaukurve der dieser Menge entsprechende Trommelwert aufgesucht. Diesem gefundenen Trommelwert entspricht aber auf der Vitamin-A-Kurve eine ganz bestimmte Menge von Vitamin-A-Einheiten, die man nun von der aus der Trommelablesung errechneten Einheiten-Menge der Mischung abziehen muß, um den endgültigen Gehalt an Vitamin A zu erhalten.

Hierbei zeigte es sich, daß die gefundenen Mengen Vitamin A stets höher waren als die ursprünglich zugegebenen. Und zwar wurde die Differenz mit dem steigenden Vitamin-A-Gehalt größer.

Ob die Ursache hiervon in einer chemischen Reaktion zwischen Carotin und Vitamin A oder in einer Farbenüberlagerung im physikalischen Sinne zu suchen ist, konnte nicht näher untersucht werden. Zweifellos ist diese Tatsache für die weitere Beurteilung der Versuche über die Umwandlung von Carotin zu Vitamin A, wo ja Carotin neben Vitamin A bestimmt werden muß, von größter Bedeutung und war für die Auswertung der Versuche zu berücksichtigen.

3. Versuche zur Umwandlung von Carotin in Vitamin A mit Hilfe überlebender Ratten-Organ-Schnitte.

Bei den Versuchen mit überlebenden Organ-Schnitten wurden zwei Versuchs-Serien durchgeführt:

1. Mit Leberschnitten von normalen Ratten,
2. Mit Leber, Milz und Niere Vitamin A freier Ratten.

Die Methodik der Versuche war im großen und ganzen so, wie sie M. von Eekelen (11) und Wendt an größerem Material benutzt hatten.

Die Organe wurden dem frisch getöteten Tiere entnommen und in physiologischer Kochsalz-Lösung von Blut und den anhaftenden größeren Bindegewebsteilen befreit; dann in etwa 1 millimeterbreite Schnitte zerteilt und diese dann abgewogen und in die kolloidale β-Carotin-Lösung gebracht. Die kolloidale Carotin-Lösung wurde nach A. Fofor und M. Schoenfeld hergestellt. Hierzu wurde eine Phosphatpuffer-Lösung von ph. 7,4 verwendet. Die Menge der Kolloidal-Lösungen sowie deren Konzentration und einzelne weitere Zusätze wird bei Beschreibung der einzelnen Versuche Erwähnung finden. Die Leberschnitte wurden dann mehrere Stunden im Thermostaten bei 38 ^{0} durchschnittlich 2 Stunden in der Carotin-Lösung geschüttelt. Neben dem Vollversuch wurde je ein Leerversuch mit Organschnitten und Carotin durchgeführt; letzterer um

einen Maßstab für die oxydierte Carotinmenge zu bekommen, wie ja bereits bei der Beschreibung der Carr Price'schen Reaktion erwähnt wurde. Nach dem Schütteln wurden die Leberschnitte abfiltriert und mit destilliertem Wasser abgewaschen, um sie von den anhaftenden, nicht in das Organgewebe eingedrungenen Carotinteilchen zu befreien. Die Lösung, zu der auch das von den Schnitten abgewaschene Carotin kam, wurde im Scheidetrichter mittels niedrig siedendem reinem Petroläther (zur Fettbestimmung) in Kohlensäure-Atmosphäre ausgeschüttelt, dieser dann mit Natriumsulfat getrocknet, wobei immer unter Kohlensäure gearbeitet wurde, um möglichst wenig Oxydationsverluste zu erhalten. Die Leberschnitte wurden in der Reibschale mit Natriumsulfat verrieben und im Soxleth ebenfalls mittels Petroläther extrahiert. Die beiden Lösungen, bei denen eine getrennte Bestimmung des Carotin- und Vitamin-A-Gehaltes durchgeführt wurde, erfuhren dann folgende Behandlung: sie wurden im Vakuum im Kohlensäurestrom bis zum Trocknen eingedampft und der Rückstand meist mit 10 ccm Chloroform aufgenommen. Diese Lösung wurde im Stufenphotometer zunächst auf ihren Gelbwert untersucht und dann mittels Stopp-Uhr genau nach 25 Sekunden nach Mischung mit Antimontrichlorid der Blauwert bestimmt.

Der Leerversuch wie auch der Carotinversuch erfuhren dieselbe Behandlung. Die Berechnung der Endwerte wurde wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, durchgeführt. Die Mengen, die zur Bestimmung Verwendung fanden, waren wie bei Aufstellung der Kurven je 3 ccm und 1 ccm Antimontrichlorid. Da die Versuche weder bei normalen noch bei Vitamin A freien Ratten eine Neubildung von Vitamin A aus Carotin erkennen ließen, wurde noch versucht, mittels Zusätzen von Milch und Olivenöl eine bessere Resorption von Carotin in das Organgewebe zu erreichen. Genaueres hierüber wird bei Beschreibung der einzelnen Versuche angeführt. Thyroxin, dessen Beziehungen zu Vitamin A in den letzten Jahren von mehreren Forschern stark wahrscheinlich gemacht wurde, konnte in einer Konzentration von 10^{-10} (nach G. Mansfeld) (13) zugesetzt, ebenfalls nicht den positiven Ausfall der Versuche veranlassen.

C. Versuchsteil.

I. Versuche mit Lebern normal ernährter Ratten.

Die Versuche wurden mit Lebern von Ratten verschiedener Altersstufen und während des Monats September durchgeführt.

	Menge Leber	Menge Carot, Lsg.	β-Carot. Konzentr.	Gelbw.u. wieder-gef.Carot.	Carot.Blau errechnet n. Kurve	Umrechn. auf Vit. A-Kurve	Abgeles. Blauwert	Errechnung der Vit. A-Geh.	Vit. A	Diff. geg Leervers.	Menge Chloroform beim Schlußvers.
Versuch 1:											
A. Vollversuch											
Leberschnitte	2 gr	20 ccm	5mg%	50 3mg%	3mg%—55	55—18E.	21=64E.	64—18=46)	+=52		20 ccm
Lösung				88=0,5mg%	85	85=2 E.	67=8 E.	8— 2=6)			Chloroform
B. Leerversuch											
Leberschnitte	2 gr	20 ccm Puff o. C.					66,5=8	8E	8E		
Lösung			ergab keinen prakt. Wert.								
Carotinversuch		20ccm koll. Car.Lsg.	5mg%	50—3mg%	Carotin, das wieder-gefunden werden soll 5 mg%		36=4,75 42 E		42 10E	2E	
Versuch 2:											
A. Vollversuch											
Leberschnitte	2 gr	20 ccm	10mg%	54 2,5mg%	2,5mg% -61	61—12E.	1 —510E.	510—12=498)	505		8 ccm
Lösung				81=0,75	0,75=81	81= 2E.	65=9E.	9— 2=7)			Chloroform
B. Leerversuch											
Leberschnitte	2 gr	200 ccm Puff. o. C.					24,5=68E.	68E.	68E.		
Lösung											
Carotinversuch	2 gr	200 ccm koll. Car. Lsg.	10mg%	50=3mg%	Carotin, das wieder-gefunden werden soll 25 mg%		2=25 mg% =400E.		400 105		

	Menge Leber	Menge Carot. Lsg.	β-Carot. Konzentr.	Gelbw. n. wieder-gef.Carot.	Carot.Blau errechnet n. Kurve	Umrechn. auf Vit. A-Kurve	Abgeles. Blauwert	Errechnung d. Vit. A. Geh.	Vit. A	Diff. geg. Leervers.	Menge Chloroform beim Schlußvers.
Versuch 3:											
A. Vollversuch											
Leberschnitte	2 gr	25 ccm	2mg%	75=1mg%	1mg%=76	76=4E.	17=100E.	100—4=96)	98		8 ccm
Lösung				95=$^1/_3$mg%	$^1/_3$mg%=93	93=1E.	80= 3E.	3—1=2)			Chloroform
B. Leerversuch											
Leberschnitte	2 gr	25 ccm Puff. o. C.					57=16 E.	16 E.	16 E.		
Lösung											
Carotinversuch		25 ccm koll. Car.Lsg.	2mg%	45=4mg%	Carotin, das wieder-gefunden werden soll 6,25 mg%		23=7mg% =73 E.		73 23	9 E.	
Versuch 4:											
A. Vollversuch											
Leberschnitte	1,5 gr	20 ccm	2mg%	69=1,3mg%	1,3mg%=73	73=5 E.	25=66 E.	66—5=61 E.)	63		8 ccm
Lösung				89=0,5mg%	0,5 =85	85=2 E.	75= 4 E.	4—2=2)			Chloroform
B. Leerversuch											
Leberschnitte	1,5 gr	20 ccm Puff. o. C.					62=12 E.		12 E.		
Lösung											
Carotinversuch		20 ccm koll. Car.Lsg.	2mg%	58=2mg%	Carotin, das wieder-gefunden werden soll 5 mg%		34=5mg% =46 E.		46 17	5 E.	

	Menge Leber	Menge Carot. Lsg.	β-Carot. Konzentr.	Gelbw. u. wieder-gef.Carot.	Carot.Blau errechnet n. Kurve	Umrechn. auf Vit. A-Kurve	Abgeles. Blauwert	Errechnung d. Vit. A. Geh.	Vit. A	Diff. geg. Leervers.	Menge Chloroform beim Schlußvers.
Versuch 5:											
A. Vollversuch											
Leberschnitte	2 gr	20 ccm	2mg%	78=0,75mg%	0,75=80	80=3E.	32= 50E.	50—3= 47)	50		8 ccm
Lösung				85=0,5	0,5=85	84=2E.	73= 5E.	5—2=3E.)			Chloroform
B. Leerversuch											
Leberschnitte	2 gr	20 ccm Puff. o. C.					61= 12E.	12E.	12E.		
Lösung											
Carotinversuch		20 ccm koll. Car.Lsg.	2mg%	64=1,25mg%	Carotin, das wieder-gefunden werden soll 5 mg%		40=4,5mg% =36 E.		36 14	2E.	
Versuch 6:											
A. Vollversuch											
Leberschnitte	2 gr	20 ccm	2mg%	92=0,3mg%	0,3mg%=90	90—1E.	22=60 E.	60—1=59)	63		8 ccm
Lösung				98 $^1/_3$ mg%	$^1/_3$mg% 93	93=1E.	72= 5 E.	5—1—4)			Chloroform
B. Leerversuch											
Leberschnitte	2 gr	20 ccm Puff. o. C.					70= 6 E.	6 E.	6 E.		
Lösung											
Carotinversuch		20 ccm koll. Car.Lsg.	2mg%	85=0,66mg%	Carotin, das wieder-gefunden werden soll 5 mg%		35—5mg% =44 E.		44 19	13	

	Menge Leber	Menge Carot. Lsg.	β-Carot. Konzentr.	Gelbw. u. wieder-gef.Carot.	Carot.Blau errechnet n. Kurve	Umrechn. auf Vit. A-Kurve	Abgeles. Blauwert	Errechnung d. Vit. A- Geh.	Vit. A.	Diff. geg. Leervers.	Menge Chloroform beim Schlußvers.
Versuch 7:											
A. Vollversuch											
Leberschnitte Lösung	1,5 gr	13 ccm	2mg%	76=1mg% 95=1/3mg%	1mg%=76 1/3mg%=93	76=4E. 93=1E.	8=170E. 62= 12E.	170—4=166) 12—1=11)	177		8 ccm Chloroform
B. Leerversuch											
Leberschnitte Lösung	1,5 gr	13 ccm Puff. o. C.					9=158E.	158E.	158		
Carotinversuch		13 ccm koll. Car. Lsg.	2mg%	85=0,5mg%	Carotin, das wieder-gefunden werden soll 3,2 mg%		63=3mg% =11E.		11 166	08E.	
Versuch 8:											
A. Vollversuch											
Leberschnitte Lösung	2 gr	20 ccm	2mg%	80—0,66mg% 95=1/3mg%	0,66 85 1/3mg%=93	85—2E. 93= 1E.	49 25E. 55=18E.	25—2=23) 18—1=17)	40		8 ccm Chloroform
B. Leerversuch											
Leberschnitte Lösung	2 gr	20 ccm Puff. o. C.					80=6E.	6E.	6E.		
Carotinversuch		20 ccm koll. Car.Lsg.	2mg%	76=1mg%	Carotin, das wieder-gefunden werden soll 5 mg%		42=4mg% =33E.		33 7	1E.	

II. Versuche mit Organen Vitamin A-frei ernährter Ratten.

Als Versuchstiere wurden jüngere Ratten von einem Durchschnittsgewicht von 80 gr verwendet. Die Haltung der Versuchstiere bestand in einer Vitamin A-freien Ernährung, deren Zusammensetzung nach Osborn-Mendel (12) hergestellt wurde. Die Tiere selbst wurden in einem verdunkelten Stall gehalten und zeigten nach 6 Wochen deutliche Zeichen einer Avitaminose, wie struppiges Fell, Haarausfall, Hautabschuppungen; eine Xerophthalmie wurde nur bei 2 Tieren in geringem Grade beobachtet. Die Durchführung der Versuche selbst geschah während des Monats Oktober.

	Menge Leber	Menge Carot. Lsg.	β-Carot. Konzentr.	Gelbw. u. wieder-gef.Carot.	Carot.Blau errechnet n. Kurve	Umrechn. auf Vit. A-Kurve	Abgeles. Blauwert	Errechnung d. Vit. A-Geh.	Vit. A	Diff. geg. Leervers.	Menge Chloroform beim Schlußvers.
Versuch 1:											
A. Vollversuch											
Leberschnitte Lösung	1 gr	20 ccm	4mg%	85 0,75 95=0,3	0,75—82 0,3=93	82=2E. 93=1E.	70 6E. 75=4E.	6 —2=4 4—1=3	7		10 ccm Chloroform
B. Leerversuch											
Leberschnitte Lösung	1 gr	20 ccm Puff. o. C.					95= 0E.	0E.			
Carotinversuch		20 ccm koll. Car. Lsg.	4mg%	70—1,3mg%	Carotin, das wiedergefunden werden soll 8 mg%		21—7,75mg% =80E.		80 —72		
Versuch 2:											
A. Vollversuch											
Leberschnitte Lösung	1 gr	20 ccm	4mg%	83—0,66mg% 75=1	0,6 85 1mg%=76	85=2E. 76=4E.	73= 5E. 60=14E.	5—2=3 14—4=10	13		10 ccm Chloroform
B. Leerversuch											
Leberschnitte Lösung	1 gr	20 ccm Puff. o. C.					85=2E.	2E.			
Carotinversuch		20 ccm koll. Car.Lsg.	4mg%	51=3mg%	Carotin, das wiedergefunden werden soll 8 mg%		29=6mg% =56E.		56 —43		

	Menge Leber	Menge Carot. Lsg.	β-Carot. Konzentr.	Gelbw. u. wieder-gef. Carot.	Carot. Blau errechnet n. Kurve	Umrechn. auf Vit. A-Kurve	Abgeles. Blauwert	Errechnung d. Vit. A-Geh.	Vit. A	Diff. geg. Leervers.	Menge Chloroform beim Schlußvers.
Versuch 3:											
A. Vollversuch											
Leberschnitte	1,5 gr	20 ccm	2mg%	82=0,66	0,66=85	85=2E.	75=4E.	4—2=2)	4		10 ccm
Lösung				85=0,66	0,66=85	85=2E.	75=4E.	4—2=2)			Chloroform
B. Leerversuch											
Leberschnitte	1,5 gr	20 ccm Puff. o. C.					90= 1E.	1E.			
Lösung											
Carotinversuch		20 ccm	2mg%	75= 1mg%	Carotin, das wieder-gefunden werden soll 4 mg%		55=3mg% =18E.		18 —14		

Da die Versuchstiere gänzlich abgemagert waren, wurde versucht, evtl. durch Zugabe von Fett zu dem Versuchsorgan in Form von 0,3 gr Rahm, positive Versuchsergebnisse zu erhalten.

Versuch 4:											
A. Vollversuch											
Leberschnitte	1 gr	20 ccm	10mg%	85=0,66mg%	0,66=85	85=2E.	83= 2E.	2—2=0)	32		10 ccm
Lösung		+0,3gr Rahm		48=3,3mg%	3,3 52	52=22E.	30=54E.	54—22=32)			Chloroform
B. Leerversuch											
Leberschnitte	1 gr	20 ccm Puff. o. C.					93=0	0E.			
Lösung		+0,3gr Rahm									
Carotinversuch		20 ccm +0,3gr. Rahm	10mg%	53=2,66	Carotin, das wieder-gefunden werden soll 20 mg%		35=5mg% =44E.		44 —12		

Dieser Versuch wurde mit Milzschnitten durchgeführt.

	Menge Leber	Menge Carot. Lsg.	β-Carot. Konzentr.	Gelbw. u. wieder-gef. Carot.	Carot. Blau errechnet n. Kurve	Umrechn. auf Vit. A-Kurve	Abgeles. Blauwert	Errechnung d. Vit. A-Geh.	Vit. A	Diff. geg. Leervers.	Menge Chloroform beim Schlußvers.
Versuch 5:											
A. Vollversuch											
Milzschnitte	0,1 gr	20 ccm	4mg%	65=1,66	1,66=69	69=7E.	56=17E.	17—7=10)	13		10 ccm
Lösung				80=0,75	0,75=82	82=2E.	72= 5E.	5—2=3)			Chloroform
B. Leerversuch											
Milzschnitte	0,1 gr	20 ccm Puff. o. C.					93= 0	0			
Lösung											
Carotinversuch		20 ccm koll. Car. Lsg.	4mg%	55 =2,5mg%	Carotin, das wieder-gefunden werden soll 8 mg%		36=5mg% =44E.		44 —31		

Nachstehender Versuch wurde ebenfalls mit Milz durchgeführt und zwar mit einer Pufferlösung, der in Olivenöl gelöstes Carotin zugesetzt war, in einer Konzentration von 4 mg%.

Versuch 6:

A. Vollversuch											
Milzschnitte	0,2 gr	20 ccm	4mg%	90=0,5	0,5=85	85=2E.	81= 2E.	2—2=0)	36		10 ccm
Lösung		+01. Öl		83=0,66	0,66=85	85= 2E.	38=38E.	38— 2=36)			Chloroform
B. Leerversuch											
Milzschnitte	0,2 gr	20 ccm Puff. o. C.					93=0	0			
Lösung		+01. Öl									
Carotinversuch		20 ccm +01. Öl	4mg%	53=2,5mg%	Carotin, das wieder-gefunden werden soll 8 mg%		22=7,5mg% =76E.		76 —40		

Die folgenden zwei Versuche wurden mit Nierenschnitten ausgeführt.

	Menge Leber	Menge Carot. Lsg.	β-Carot. Konzentr.	Gelbw. u. wieder-gef. Carot.	Carot. Blau errechnet n. Kurve	Umrechn. auf Vit. A-Kurve	Abgeles. Blauwert	Errechnung d. Vit. A- Geh.	Vit. A	Diff. geg. Leervers.	Menge Chloroform beim Schlußvers.
Versuch 7:											
A. Vollversuch											
Nierenschnitte	0,4 gr	20 ccm	4mg%	80—0,75	0,75—82	82—2E.	73— 5E.	5—2—3)	29E.		10 ccm
Lösung				70—1,3	1,3—74	74—4E.	42—30E.	30—4—26)			Chloroform
B. Leerversuch											
Nierenschnitte	0,4 gr	20 ccm Puff. o. C.					90— 1E.	1E.	1E.		
Lösung											
Carotinversuch		20 ccm koll. Car. Lsg.	4mg%	75— 1mg%	Carotin, das wieder-gefunden werden soll 8 mg%		45—4mg% —30E.		30 — 1		

Hier wurde ebenfalls Fett in Form von Rahm zugesetzt.

Versuch 8:											
A. Vollversuch											
Nierenschnitte	0,3 gr	20 ccm	5mg%	92 0,3	0,3 13	93—1E.	87— 2E.	2—1—1)	41		10 ccm
Lösung		+0,5gr Rahm		36 5mg%	5 35	35 44	20 84E.	84—44—40)			Chloroform
B. Leerversuch											
Nierenschnitte	0,3 gr	20 ccm Puff. o. C.					92—0	0	0		
Lösung											
Carotinversuch		20 ccm koll. Car. Lsg.	5mg%	30—6mg%	Carotin, das wieder-gefunden werden soll 10 mg%		18—8,5mg% —82E.		82 —41		

Da in einer neuen Arbeit von G. Mansfeld (14) der Vitamin A-Stoffwechsel in enge Beziehung zum Thyroxin des Körpers gebracht wurde und Versuchsergebnisse berichtet wurden, bei denen sich bei Thyroxinverabreichung in geringen Konzentrationen (starke bewirken das Gegenteil) eine Steigerung des Vitamin A-Stoffwechsels herbeiführen ließ, setzten wir bei den beiden folgenden Versuchen Thyroxin in einer Menge von 1 ccm und einer Verdünnung von 10^{-10} zu.

	Menge Leber	Menge Carot. Lsg.	β-Carot. Konzentr.	Gelbw. u. wieder-gef. Carot.	Carot. Blau errechnet n. Kurve	Umrechn. auf Vit. A-Kurve	Abgeles. Blauwert	Errechnung d. Vit. A-Geh.	Vit. A	Diff. geg. Leervers.	Menge Chloroform beim Schlußvers.
Versuch 9:											
A. Vollversuch											
Leberschnitte	1,5 gr	20 ccm	4mg%	62=2	2=65	65=9E.	54— 19	19—9=10)	10		10 ccm
Lösung				95—0,3	0,3=93	93=1E.	92= 1	1—1=0)			Chloroform
B. Leerversuch											
Leberschnitte	1,5 gr	20 ccm Puff. o. C.					92= 1	1E.			
Lösung											
Carotinversuch		20 ccm	4mg%	45=3,66	Carotin, das wiedergefunden werden soll 8 mg%		35=5mg% =44E.		44 —34		
Versuch 10:											
A. Vollversuch											
Leberschnitte	1,5 gr	20 ccm	4mg%	93 0,3	0,3 93	93—1E.	90— 1	1—1=0)	0		10 ccm
Lösung		+0,5gr	Rahm	90—0,5	0,5=85	85= 2E.	87=2	2— 2= 0)			Chloroform
B. Leerversuch											
Leberschnitte	1,5 gr	20 ccm Puff. o. C.					95=0E.	0E.			
Lösung											
Carotinversuch		20 ccm koll.	4mg%	45=3,66	Carotin, das wiedergefunden werden soll 8 mg%		36=5mg% =44E.		44 —44		

D. Zusammenfassung.

1.

Bei den Vorversuchen ergab sich, daß auch Vitamin A unwirksames teilweise oxydiertes Carotin die Blaureaktion mit Antimontrichlorid liefert.

2.

Durch experimentelle Versuche wurde gefunden, daß konzentrierte Salzsäure imstande ist, die bei unvorsichtigem Arbeiten durch Bildung von Antimonhydroxyd entstehende Trübung bei der Carr Price'schen Reaktion zum Verschwinden zu bringen, ohne dabei Carotin oder Vitamin A zu verändern.

3.

Außerdem zeigte sich, daß bei einem Gemisch von Carotin und Vitamin A der nach der Blaureaktion nach Carr Price wiedergefundene Vitamin A-Wert stets höher war als der ursprünglich zugegebene. Eine Erklärung hierfür konnte nicht gefunden werden. Die zu groß gefundenen Werte stiegen mit der zunehmenden Vitamin A-Konzentration.

4.

Bei den Hauptversuchen zeigte sich, daß zwar eine Aufnahme von Carotin in die Organgewebe der Leber, Nieren und Milz stattgefunden hat, daß aber diese Aufnahme vor allen Dingen in den bindegeweblichen Teilen der Organe erfolgte.

Mit Hilfe überlebender Organ-Schnitte von Leber, Nieren und Milz normaler und Vitamin A-freier Albino-Ratten konnte mit der beschriebenen Methodik keine Umwandlung von Carotin in Vitamin A nachgewiesen werden.

Bei der Durchführung der Versuche mit Vitamin A-freien Organen zeigte sich zwar eine größere Zerstörung von Carotin, das auch als Blauwert nicht mehr gefunden werden konnte, sodaß die Annahme berechtigt ist, daß vielleicht eine Vorstufe von Vitamin A entsteht, die mit der Carr Price'schen Reaktion nicht nachgewiesen werden kann.

Schrifttum:

1. Willstaedt, Harry: „Die Vitamine", Kli-Wo. Nr. 24 (1935).
2. Lederer, H.: „Les caroténoides des plantes." Paris, Hermann & Co. (1934).
3. Moore, Th.: Lancet 1929 II, 380. Biochemic. Journ. 24, 692 (1930).
4. C. Olcott u. Mc. Cann: Journ. of Biol. Chem. 94, 285 (1931).
5. J. Rea u. Drummond: Zeitschrift Vitaminforschung 1, 177 (1932).
6. H. Euler u. Klussmann: 1. SO. Vet. Akad. Arch. f. Chemie II, 1 (1932).
7. Fearon: Biochemic. Journal 19, 888 (1925).
8. Bessanoff: Bull. Soc. Chem. Biol. Paris 11, 294 (1929).
9. Carr, C. S.: Biochemic. Journ. 20, 497 (1926).
10. Rosenthal, E.: Kli-Wo. 1935, 307.
11. Eekelen, M. V.: Kli-Wo. 1935. 829.
12. Bomskov, Chr.: „Methodik der Vitaminforschung," Gg. Thieme, Leipzig (1935).
13. Mansfeld, G.: „Art und Ort der Thyroxinwirkung." Kli-Wo. Nr. 25, 884 (1935).

Herrn Prof. Dr. L. R. Müller sei für die freundliche Uebernahme des Referates mein Dank ausgesprochen.

Lebenslauf.

Am 16. Januar 1910 wurde ich als Sohn des Forstassistenten Konrad Graebner in Schliersee geboren. Nach dem üblichen Volksschulbesuch trat ich in die Realschule in Freising ein und erhielt das Reifezeugnis der Oberrealschule Amberg i. d. O. (1931).

Mein medizinisches Studium begann ich an der Universität Erlangen, studierte je ein Semester in München und Hamburg und bestand mein medizinisches Staatsexamen im Herbst 1936 an der Universität Erlangen.